

University of Groningen

Unraveling structural and functional features of secondary transport proteins

Heuberger, Esther Helena Maria Laurentius

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2001

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Heuberger, E. H. M. L. (2001). *Unraveling structural and functional features of secondary transport proteins*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting voor de leek

Inleiding: een aantal basis begrippen

De bacterie en haar belang voor mens en wetenschap.

Het leven op aarde heeft zijn oorsprong zo'n 3,5 miljard jaar geleden, met het ontstaan van de eerste bacteriecel. Deze "oer-cel" is de basis geweest waaruit vervolgens alle levende organismen en de cellen waaruit ze zijn opgebouwd zijn geëvolueerd. Een bacterie bestaat uit één cel. Aangezien alle processen die nodig zijn voor het bestaan van de bacterie en haar voortplanting binnen deze ene cel plaatsvinden, is zij de kleinste eenheid die in staat is tot leven. Ondanks haar relatieve eenvoud vormt zij tot op de dag van vandaag de meest omvangrijke populatie van alle levende organismen. Hoewel bacteriën voornamelijk bekend staan als bron van ziekten en infecties, spelen ze een belangrijke rol in de natuur. Zonder bacteriën zouden wij niet kunnen bestaan. Bacteriën zijn in ons lichaam bijvoorbeeld betrokken bij de spijsvertering, en in de natuur zijn ze onmisbaar voor de afbraak van organisch materiaal en het vastleggen van stikstof. Bacteriën worden ook veelvuldig ingezet in onze voedselproductie, bijvoorbeeld voor de bereiding van kaas, yoghurt en zuurkool.

Aan de andere kant van de evolutionaire ladder staat de mens, die in tegenstelling tot de bacterie opgebouwd is uit miljarden cellen. Deze cellen moeten veel verschillende functies uitvoeren en voortdurend met elkaar communiceren. Desondanks vinden vele processen in de menselijke cellen op vergelijkbare wijze plaats in de bacteriële cel. Omdat de bacterie een relatief eenvoudig organisme is, vormt zij

een ideaal modelsysteem om deze processen te bestuderen. Onder optimale omstandigheden, kan een enkele bacterie cel zich elke 20 minuten delen. Op die manier kan één cel binnen 24 uur uitgroeien tot een populatie van zo'n 5.000 triljoen cellen, die allemaal aan elkaar gelijk zijn. Hierdoor is er altijd voldoende materiaal aanwezig om mee te kunnen werken.

De membraan.

Cellen van alle organismen zijn omgeven door een membraan die ondoorlaatbaar is voor moleculen die in water oplosbaar zijn. Dat komt omdat een membraan is opgebouwd

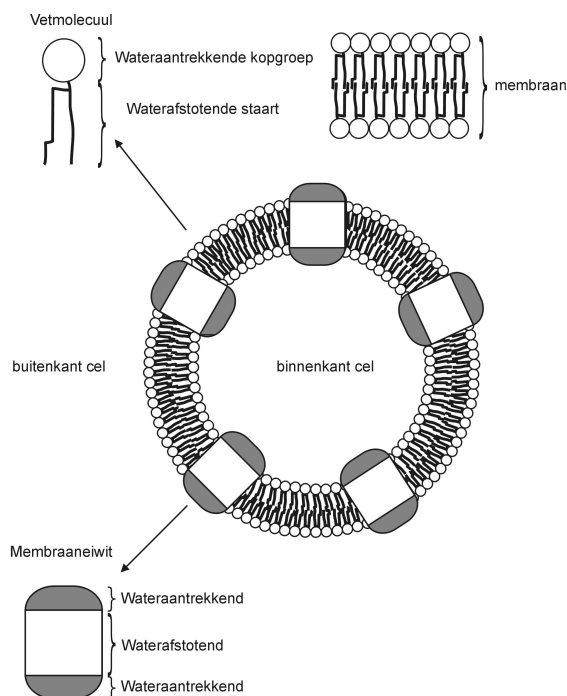


Fig. 1. De opbouw van een cel. De cel is omgeven door een dubbele laag vetmoleculen die een afscheiding vormen tussen de binnen en de buitenkant van de cel. In deze membraan zijn de membraanewitten gelegen

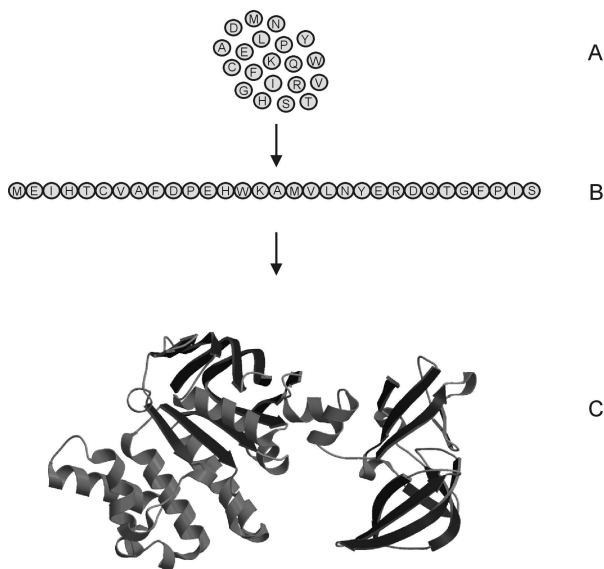


Fig.2. Opbouw en structuur van eiwitten. A. De 20 verschillende aminozuren waaruit eiwitten zijn opgebouwd. B. "Primaire" structuur van een eiwit. C. "Tertiaire" ofwel driedimensionale structuur van een eiwit. In de driedimensionale structuur van eiwitten zijn verschillende structuren aanwezig zoals spiralen (grijs) of vlakken (zwart).

uit een dubbele laag van vetmoleculen (Fig.1). Vetmoleculen hebben een kop die water aantrekt en een staart die water afstoot. Omdat de staarten van deze vetmoleculen niet in een waterig milieu kunnen zitten, organiseren zij zich zo dat alle staarten naar elkaar toe staan en van het waterige milieu afgeschermd worden door de kopgroepen die zich naar het water toe keren. Voor het voortbestaan van een organisme is het van groot belang dat een aantal stoffen, die nodig zijn voor de groei en voor het regelen van een heleboel ingewikkelde processen binnen in de cel, de membraan kan passeren. Daarom heeft elke cel een groot aantal eiwitten in de membraan zitten die deze stoffen herkennen en op een actieve manier naar binnen kunnen transporteren.

Wat zijn eiwitten en wat doen ze?

Wat zijn eiwitten? Eiwitten worden aangetroffen in al het levend materiaal dat op

aarde te vinden is en ze spelen een cruciale rol in vrijwel alle biologische processen. Er zijn veel verschillende soorten eiwitten, die allemaal een andere specifieke functie hebben. Eiwitten kunnen bijvoorbeeld fungeren als katalysatoren van chemische reacties, waarbij ze in staat zijn deze reacties mogelijk te maken of te versnellen (tot een miljoen keer). Eiwitten met zo'n katalyserende functie worden enzymen genoemd. Er zijn ook eiwitten die betrokken zijn bij het transport van stoffen van de ene plaats naar de andere plaats. Dit kan transport door de membraan zijn, of transport binnen in de cel zelf. Zo is bijvoorbeeld het eiwit hemoglobine in onze rode bloedlichaampjes verantwoordelijk voor het transport van zuurstof. Andere functies van eiwitten zijn bijvoorbeeld het verlenen van stevigheid aan botten en huid, de beweging van spieren, de afweer tegen lichaamsvreemde stoffen zoals bijvoorbeeld bacteriën enzovoorts.

Hoe zien eiwitten eruit en wat verstaan we onder structuur?

Eiwitten zijn opgebouwd uit aminozuren, waarvan er in de natuur 20 verschillende voorkomen (Fig. 2A). Deze 20 aminozuren kunnen een keten van een willekeurige volgorde en een willekeurige lengte vormen. De functie van een enkel eiwit wordt bepaald door de volgorde van de aminozuren in zo'n keten, de lengte van de keten en de ruimtelijke vouwing die zo'n keten aan kan nemen. De volgorde van de aminozuren in de keten wordt de "primaire structuur" van het eiwit genoemd (Fig. 2B). De primaire structuur kan worden gebruikt om de verschillen en overeenkomsten tussen eiwitten te bestuderen. Vaak vertonen eiwitten, die een vergelijkbare functie uitvoeren (bijvoorbeeld transport van suikers), overeenkomsten in de primaire structuur. Dat wil zeggen dat op bepaalde plaatsen in de keten, de aminozuurvolgorde hetzelfde is. Dit maakt het mogelijk om eiwitten, op basis van hun primaire structuur, in te delen in families

van eiwitten met een vergelijkbare functie. Zo kunnen voorspellingen gedaan worden over de functie van een eiwit waar verder geen onderzoek aan is verricht. Er wordt voortdurend getracht algemene principes in de primaire structuur van eiwitten te ontdekken, om op die manier een groter begrip te verkrijgen van de fascinerende processen die in de natuur plaats vinden. De ruimtelijke vouwing van de keten van aminozuren wordt de “tertiaire”, ofwel driedimensionale, structuur genoemd (Fig. 2C). Wanneer de driedimensionale structuur van een eiwit bekend is, weet men precies welk aminozuur waar zit. Omdat de driedimensionale structuur van een eiwit laat zien welke aminozuren direct met elkaar in contact staan, vormt deze een belangrijk hulpmiddel bij het oplossen van de werking van een eiwit.

Vaak functioneren eiwitten niet als onafhankelijke eenheden, maar vormen ze een complex van meerdere eiwitten. Een complex kan bestaan uit een aantal dezelfde eiwitten, maar kan ook opgebouwd zijn uit verschillende eiwitten. Wanneer eiwitten een complex vormen wordt er gesproken van “quaternaire structuur”. Eiwit-eiwit interacties spelen een belangrijke rol in de functie van eiwitten en de regulatie van processen waarbij eiwitten betrokken zijn.

Een speciale klasse van eiwitten: de membraaneiwitten.

Eiwitten kunnen in twee categorieën worden ingedeeld, de wateroplosbare eiwitten en de membraaneiwitten. Binnen in de cel is de omgeving waterig, en hier voeren de wateroplosbare eiwitten hun functie uit. De membraaneiwitten liggen ingebed in de membraan van een cel, maar bevatten vaak ook delen die buiten de membraan in de waterige omgeving uitsteken (binnen of buiten de cel). Door het waterafstotende karakter van de membraan moet ook het gedeelte van het eiwit dat in de membraan ligt een waterafstotend karakter hebben. Door de grote hoeveelheid verschillende eiwitten in de

membraan is het niet makkelijk is om de eigenschappen van één afzonderlijk membraaneiwit te bestuderen. Om dit mogelijk te maken worden deze eiwitten van de membraan gescheiden. Buiten de omgeving van de membraan zal het tweeledige karakter van deze eiwitten voor problemen zorgen: sommige gedeelten van het eiwit lossen goed op in water, terwijl het oorspronkelijke in de membraan ingebedde deel van het eiwit het water juist afstoot (Fig. 1). Deze normaal ingebedde gedeelten van het eiwit zullen elkaar aantrekken om zich van het waterige milieu af te screenen. Hierdoor ontstaat een klontering van eiwitten. Door deze klontering, aggregatie genoemd, verliezen de eiwitten hun originele structuur waardoor ze niet meer bruikbaar zijn om te bestuderen. Om te voorkomen dat membraan-eiwitten gaan aggregaten wanneer ze uit de membraan gehaald worden, wordt er aan de eiwitten een milde zeep toegevoegd. Zeep bestaat uit moleculen die vergelijkbaar zijn met de vetmoleculen in de membraan. De zeepmoleculen rangschikken zich als een kraag om het waterafstotende gedeelte van het membraan eiwit waarbij de staarten van de zeepmoleculen naar het eiwit gericht zijn. Hierdoor wordt het gehele eiwit als het ware wateroplosbaar gemaakt.

Waarom is het interessant en belangrijk om te begrijpen hoe membraan-eiwitten functioneren? Al het contact van de cel met de omgeving verloopt via de membraan. Aangezien de membraan zelf ondoorlaatbaar is, zijn het de membraan-eiwitten die zorgen voor de opname van voedingsstoffen en het uitscheiden van afvalstoffen. Ook bij het inspelen op veranderingen in de omgeving van de cel spelen membraaneiwitten een belangrijke rol. Zo zijn er membraaneiwitten die signalen van buiten de cel opvangen en vertalen in een antwoord van de cel. Dit antwoord kan bestaan uit de aanmaak van eiwitten die in staat zijn ruim voorradige voedingsstoffen op te nemen, of het verplaatsen van de cel van

Chapter 7

een voedselarme naar een voedselrijke omgeving.

Transporteiwitten.

Een groot gedeelte van de membraaneiwitten heeft een transport functie: deze eiwitten zijn verantwoordelijk voor het transport van voedingsstoffen de cel in of van afvalstoffen de cel uit. Dit transport kost energie. Er zijn drie verschillende vormen van energie die de cel kan gebruiken voor transport. Afhankelijk van welke vorm ze gebruiken worden de membraaneiwitten die bij transport betrokken zijn onderverdeeld in drie categorieën. Eén van die categorieën is die van de secundaire transporters, en eiwitten uit deze categorie worden beschreven in dit proefschrift.

Het belang van onderzoek naar transport-eiwitten.

De laatste jaren is de interesse in de functie en de structuur van transporteiwitten enorm toegenomen. Steeds vaker blijkt dat ziektebeelden bij de mens veroorzaakt worden door beschadigingen in deze eiwitten. Zo wordt de concentratie van neurotransmitters, stoffen die verantwoordelijk zijn voor het doorgeven van signalen in het zenuwstelsel, zeer strict gereguleerd door de aanwezigheid van transporteiwitten. Defecten in deze eiwitten kunnen leiden tot ernstige neurologische of psychiatrische afwijkingen. Ook de veel voorkomende ziekte diabetes wordt veroorzaakt door de verstoorde regulatie van glucose transporteiwitten in de membranen van niercellen. Niet alleen bij het ontstaan van ziekten, maar ook bij het bestrijden van ziekten kunnen transporters een belangrijke rol spelen. Een steeds groter wordende bedreiging voor de volksgezondheid is de weerstand van bacteriën tegen allerlei antibiotica. Hierdoor zijn bacteriële infecties steeds moeilijker te bestrijden (een bekend voorbeeld is de “ziekenhuisbacterie” MRSA). Oorzaak van deze weerstand tegen antibiotica is de

aanwezigheid van transporteiwitten in de bacteriële celmembraan, die de antibiotica de cel uitpompen voordat deze hun werk hebben kunnen doen. Vergelijkbare transporteiwitten in de mens zijn verantwoordelijk voor de opbouw van weerstand van kankercellen tegen kankergeneesmiddelen. Behalve in de geneeskunde spelen transporteiwitten ook een grote rol in biotechnologische toepassingen, zoals bijvoorbeeld bij de bereiding van kaas en yoghurt.

Om de processen waarvoor de transporteiwitten verantwoordelijk zijn te begrijpen en eventueel te verbeteren, is gedegen kennis van deze eiwitten noodzakelijk. Hiervoor wordt onderzoek gedaan naar de structuur en de functie van deze eiwitten. Van het eerste, de structuur, is tot nu toe weinig bekend. De belangrijkste vraag hier is: hoe ziet het eiwit eruit? Van de functie van veel transporteiwitten is gelukkig meer bekend. Hier zijn de vragen: welk eiwit transporteert wat? hoe snel gaat dat? hoeveel energie kost dat? In dit proefschrift wordt een bijdrage geleverd aan het ontrafelen van zowel functionele als structurele aspecten van transporteiwitten. Dit wordt gedaan door gedetailleerde studies aan twee suiker-transporteiwitten uit melkzuurbacteriën: het xyloside transporteiwit uit de bacterie *Lactobacillus pentosus* en het lactose transporteiwit uit de bacterie *Streptococcus thermophilus*.

Het xyloside transporteiwit, XylP, uit *Lactobacillus pentosus* en het lactose transporteiwit, LacS, uit *Streptococcus thermophilus*

Lactobacillus pentosus is een bacterie die betrokken is bij de fermentatie van planten zoals olijven, komkommers en kool. Deze bacterie is voor haar voedselaanvoer afhankelijk van de afbraakprodukten van deze planten. Dit materiaal bestaat voornamelijk uit grote suikerketens, cellulose en hemicellulose. Nu beschikt *Lactobacillus pentosus* niet over de eiwitten die deze grote

suikerketens kunnen afbreken tot kleinere suikers die vervolgens door de cel opgenomen kunnen worden. Daarom is *Lactobacillus* afhankelijk van de aanwezigheid van andere bacteriën die dit wel kunnen. Vervolgens snoept *Lactobacillus* mee van de kleinere suikers die door die andere bacteriën beschikbaar worden gemaakt. Eén van deze suikers is xylose. Op grond van de DNA volgorde van *Lactobacillus* werd tot voor kort aangenomen dat xylose in de cel wordt opgenomen door het transporteiwit XylP. In hoofdstuk drie van dit proefschrift wordt het XylP eiwit gekarakteriseerd. Het bleek dat dit eiwit een ander afbraakproduct van de plant transporteert, de suiker isoprimeverose. Isoprimeverose dankt zijn naam aan de sleutelbloem (*primula*), waaruit deze suiker voor het eerst geïsoleerd is.

De isoprimeverose transporter, XylP, behoort tot een familie van secundaire transporteiwitten die allemaal suikers transporteren. Een ander transporteiwit uit deze familie is het inmiddels goed gekarakteriseerde lactose transporteiwit, LacS, uit de bacterie *Streptococcus thermophilus*. Deze bacterie groeit in melk, die rijk is aan het melksuiker lactose (waarvoor sommige mensen allergisch zijn). Alle eiwitten uit deze familie van suiker transporteiwitten vertonen overeenkomsten in de volgorde van aminozuren in de eiwitketen (de primaire structuur). Door XylP en LacS uitgebreid te bestuderen wordt getracht een aantal basisprincipes te achterhalen die gelden voor het transportmechanisme en de uiteindelijke structuur van alle eiwitten uit deze familie.

Voorwaarden die verbonden zijn aan het bestuderen van transporteiwitten

Om het mechanisme van transporteiwitten te kunnen bestuderen, moet er aan een verschillende voorwaarden worden voldaan. Er moet voldoende substraat (de stof die getransporteerd wordt) aanwezig zijn om proeven te kunnen doen. Er moet een goede

proefopzet zijn om de activiteit van het afzonderlijke transporteiwit te kunnen meten. Tot slot moet er een goede methode voorhanden zijn om te meten hoeveel substraat getransporteerd wordt. Bij het begin van het werk beschreven in dit proefschrift was voor de studie van het transporteiwit XylP aan geen van deze drie voorwaarden voldaan.

Ten eerste het substraat. De meeste suikers die door transporteiwitten worden opgenomen zijn eenvoudigweg te koop. Isoprimeverose is echter niet te koop, wat betekent dat je het óf eigenhandig moet isoleren uit natuurlijk materiaal waarin isoprimeverose voorkomt óf moet maken middels een scheikundige synthese. De isolatie van isoprimeverose uit plantenmateriaal is zeer moeizaam en erg inefficiënt. Daarom is een methode ontwikkeld om deze suiker chemisch te maken (hoofdstuk 3). Hiermee werd aan de eerste voorwaarde voldaan.

Ten tweede de proefopzet. Om een transportreactie te karakteriseren is het nodig dat de suiker getransporteerd wordt tussen twee compartimenten die van elkaar gescheiden zijn. Dit is zo in de cel, waar de binnenkant van de cel van de buitenomgeving gescheiden wordt door de membraan (waarin de transporteiwitten gelegen zijn). Omdat de membraan vol zit met allerlei verschillende eiwitten, is het moeilijk om naar het mechanisme van slechts één soort eiwit te kijken. Daarom wordt het te bestuderen eiwit uit de membraan van de cel gehaald en in kunstmatige membranen geplaatst. Deze kunstmatige membranen zijn uit dezelfde vetmoleculen opgebouwd als de cel-membraan, maar zijn vrij van andere eiwitten. Het zuiveren van een membraaneiwit en het terugplaatsen in een nieuwe membraan is meestal niet erg eenvoudig omdat in elke stap van de procedure het eiwit kan gaan aggregeren door toedoen van de niet ideale omgeving waarin het eiwit opgelost is. Hoofdstuk 3 van dit proefschrift is gewijd aan de moeilijke procedure om het XylP eiwit uit

de membraan te zuiveren, het vinden van de optimale condities waarin het eiwit zo lang mogelijk opgelost blijft in een waterige oplossing en vervolgens aan het vinden van de optimale methode om het eiwit terug te plaatsen in kunstmatige membranen. Voor deze procedure is het essentieel dat de aktiviteit van XylP niet verloren gaat door allerlei experimentele problemen, zodat na het plaatsen van XylP in de kunstmatige membraan nog steeds transport gemeten kan worden.

Om vervolgens het transportproces te kunnen volgen moet men beschikken over een goede meetmethode. De conventionele methode maakt gebruik van een radio-actief label dat aan het te transporteren substraat hangt. Doordat het mogelijk is op verschillende tijdstippen in de transportreactie de bacteriële of de kunstmatige membranen te scheiden van de hun omgevende vloeistof, kan specifiek de hoeveelheid radio-actief label die zich binnenin de membranen verzameld heeft als gevolg van de transportreactie gemeten worden. Voor vele suikers is er een radio-actief gelabelde variant commercieel verkrijgbaar, maar van isoprimeverose niet. Dit heeft geleid tot de ontwikkeling van een nieuwe methode waarbij het gebruik van radio-activiteit niet meer nodig is. Deze methode staat beschreven in hoofdstuk 2 van dit proefschrift.

Nadat aan alle voorwaarden die nodig waren om het transporteiwit XylP te kunnen bestuderen was voldaan, kon de transportreactie gekarakteriseerd worden. Met behulp van het zelf gemaakte isoprimeverose, de kunstmatige membranen met XylP en de nieuw ontwikkelde meetmethode werd bevestigd dat isoprimeverose inderdaad door het XylP eiwit getransporteerd wordt. Uit deze studies bleek onder andere dat wanneer er voldoende isoprimeverose aanwezig is, één molecuul XylP ongeveer 44 suikermoleculen per minuut de cel in kan transporteren.

Techieken om naar de quaternaire structuur van transporteiwitten te kijken

Behalve het transport mechanisme is ook de quaternaire structuur van XylP bestudeerd en vergeleken met een ander transporteiwit uit dezelfde familie, de lactose transporter LacS. Uit eerdere studies aan het LacS eiwit was gebleken dat dit eiwit niet als één enkel eiwit functioneert, maar altijd in samenwerking met een ander LacS eiwit. Wanneer twee eiwitten met elkaar een structureel geheel vormen, wordt de quaternaire structuur van het eiwit een dimeer genoemd. De aanwezigheid van een dimere structuur kan in de natuur verschillende betekenissen hebben. Er kan bijvoorbeeld een structurele relevantie zijn om een eenheid te vormen. Hiermee wordt bedoeld dat de vorming van een dimeer gunstig is omdat deze bijvoorbeeld minder plek inneemt in de membraan, of omdat er twee eiwitten nodig zijn om een transport kanaal te vormen. In het laatste geval vormt één enkel eiwit dus een incomplete en inactieve transporter. De vorming van een dimeer kan ook functioneel van belang zijn. Er zijn transporters bekend die op zichzelf een volledig transportkanaal kunnen vormen maar die niet actief zijn als ze niet verbonden zijn met een tweede eiwit. Deze eiwitten hebben elkaar dan nodig om te kunnen functioneren.

Er zijn verschillende technieken die gebruikt kunnen worden om de quaternaire structuur van membraaneiwitten te kunnen bestuderen. Met sommige technieken kan de quaternaire structuur van membraaneiwitten bestudeerd worden terwijl het eiwit ingebed ligt in de membraan. Andere technieken vereisen echter de zuivering van de eiwitten uit de membraan. Het risico van aggregatie wanneer het eiwit uit zijn natuurlijke omgeving is gehaald maakt dit soort onderzoek vaak erg moeizaam, en vergt een grote nauwkeurigheid en een kritische evaluatie van de verkregen resultaten. Dit komt omdat de quaternaire structuur

bestudeerd wordt door de grootte van eiwitcomplexen te meten, waaruit wordt afgeleid of de complexen uit één, twee of meer eiwitten bestaan. Het is dus nodig om het verschil te kunnen zien tussen complexen die “van nature” bestaan, en eventuele eiwitcomplexen die tijdens het meten zijn ontstaan door aggregatie. De betrouwbaarste resultaten worden verkregen door verschillende technieken en verschillende omstandigheden te combineren.

In hoofdstuk 4 van dit proefschrift zijn drie van die technieken gebruikt om de quaternaire structuur van het XylP eiwit te bestuderen. Een van deze technieken maakte het mogelijk om de structuur van het eiwit in de membraan te analyseren. Voor de andere twee technieken was het noodzakelijk het eiwit eerst uit de membraan te zuiveren. De combinatie van de verschillende technieken leidde tot de conclusie dat XylP, net als LacS, een dimeer vormt. Dit zou kunnen betekenen dat de vorming van grotere eiwitcomplexen een algemeen verschijnsel binnen deze familie van transporteiwitten is. Om dit met zekerheid vast te stellen zouden uiteraard meerdere eiwitten uit de familie onder de loep genomen moeten worden.

Algemeen beeld van de quaternaire structuur van secundaire membraan-eiwitten en de functie die aan dit fenomeen verbonden kan zijn

De afgelopen 10 jaar zijn wetenschappers naarstig op zoek geweest naar de tertiare ofwel driedimensionale structuur van membraaneiwitten. Tot nu toe is er nog niemand in geslaagd om de structuur op te helderen van een transporteiwit dat behoort tot de secundaire transporteiwitten. Het falen van het structuur onderzoek tot nu toe is, zoals reeds meermaals aangehaald, te wijten aan het feit dat membraaneiwitten moeizaam

te hanteren zijn. Met behulp van het combineren van een groot aantal technieken wordt er desondanks steeds meer progressie gemaakt in het structuuronderzoek.

Voor de wateroplosbare eiwitten is het bestaan van grotere eiwitcomplexen een algemeen geaccepteerd en veel voorkomend verschijnsel. Eiwitcomplexen bieden in de natuur veel voordeel: het maakt het makkelijker om processen te reguleren en de functies van een eiwit kunnen in een complex worden uitgebreid. Aangezien transporteiwitten aan de basis staan van veel processen die in de cel plaats vinden is het onwaarschijnlijk dat deze eiwitten als onafhankelijke eenheden opereren. Het is aannemelijk dat, in de loop van de evolutie, transporteiwitten interacties zijn aangegaan met andere membraaneiwitten, of met wateroplosbare eiwitten die in de cel signalen kunnen doorgeven.

Wanneer het quaternaire structuur onderzoek van secundaire transporteiwitten van de afgelopen jaren grondig bestudeerd wordt, valt inderdaad op dat het merendeel van deze eiwitten georganiseerd zijn in grotere complexen. Op dit moment is slechts voor een paar eiwitten ook een functie toegekend aan de vorming van eiwitcomplexen (Hoofdstuk 5 van dit proefschrift).

Samenvattend komen er dus steeds meer aanwijzingen voor het fascinerende idee dat de natuur gebruik maakt van het proces van eiwitcomplex-vorming van membraan-eiwitten. Dit leidt tot de overtuiging dat de membraan niet alleen maar een afscheiding vormt tussen de binnen- en buitenkant van de cel. De membraan is een goed georganiseerde structuur waar intensieve regulatie van processen plaats vindt via eiwit-eiwit interacties.

